

(Aus dem Hygiene-Institut der Universität Basel
[Vorsteher: Prof. Dr. J. Tomcsik].)

Ersatz des Rinderalbumins (Fraktion V) durch Vollserum in Dubosschen Nährböden

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Hans Scholer

von Zunzgen (Baselland)



1951

VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Von der Medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von
Prof. *J. Tomcsik*.

Tag der Promotion: 9. November 1951.

Sonderdruck aus «Schweiz. Zeitschrift für Allgemeine Pathologie
und Bakteriologie», Vol. XIV, Nr. 5

Ersatz des Rinderalbumins (Fraktion V) durch Vollserum in Dubosschen Nährböden.

Dubos und Mitarbeiter lehrten die hervorragende Bedeutung von Serumalbumin für die Kultur von Tuberkelbazillen. Sie empfahlen die durch das Äthanolverfahren nach Cohn aus Rinderplasma gewonnene «Fraktion V.» (fr.V.), die fast zu hundert Prozent aus Albumin besteht, als Zusatz zu ihren Nährböden. Kein anderer Eiweißkörper könne das Albumin ersetzen. Selbst Vollserum, das ja das gleiche Albumin auch enthalten muß, wird von *Dubos* abgelehnt. Er fand nämlich neben Vollsera (von Rind und Mensch), die dem Albumin gleichwertig waren, solche mit einer wachstumshemmenden Eigenschaft (1, 2, 3, 4). Das schädliche Agens soll sich samt den Globulinen ausschalten lassen, wenn man Serum ansäuert, erhitzt, neutralisiert und das ent-

stehende Präzipitat entfernt (ibidem). Wie eng die Noxe mit der gleichzeitig ausgefällten Globulinfraktion zusammenhängt, wird nicht beschrieben. Die Globuline selbst haben sich jedenfalls nach *Davis* und *Dubos* als Nährbodenzusatz so schlecht bewährt, daß geradezu von Wachstumshemmung zu reden ist (5).

Demgegenüber zeigten *Youmans* u. Mitarb., daß Rinder-Vollserum die Vermehrungsgeschwindigkeit von Tuberkelbazillen stärker beschleunige als Albumin (6, 7, 8). Albumin fr.V. sei auch nicht das am meisten wachstumsfördernde Produkt der Äthanolfraktionierung. Es werde durch Proantithrombin, ein Pseudoglobulin, übertroffen, das allein die Wirksamkeit von Vollserum erreiche. Ferner hemmen nach *Youmans* die Globuline nie, sondern fördern fast alle das Wachstum, und zwar in ihrer Mehrzahl ebenso stark wie Albumin (7).

Wenn sich *Youmans* in diesen Punkten zu *Dubos* in einen ausdrücklichen, schroffen Gegensatz stellt, beachtet er nicht, daß *Dubos* stets mit Nährböden arbeitete, die außer einem Eiweißkörper zusätzlich Ölsäure oder Tween enthielten, was nach unserer Meinung die Vergleichbarkeit der Resultate zum mindesten beeinträchtigt.

Youmans arbeitete mit einer originellen, relativ einfachen Methode, die kleine Unterschiede in Wachstumsförderung und -hemmung sehr genau erfaßt und einen Rückschluß auf die Generationszeit der verwendeten Tuberkelbazillen erlaubt (6). Bei gegebenem Stamm ist die Generationszeit für jeden Nährboden charakteristisch. Zugesezt zu einem synthetischen Grundnährboden, ergaben nach *Youmans* Rinder-Vollserum und Proantithrombin bei H37Rv eine Generationszeit von 14,4 h, welche den kürzesten überhaupt erreichbaren Wert bedeuten soll, während Albumin fr.V. und die meisten Globuline eine solche von 16,9 h bewirkten.

Das Prinzip der Methode von *Youmans*, die wir selbst vielfach angewendet haben, sei kurz erläutert:

Wie *Youmans* und Mitarbeiter schon früher anhand von Mikro-Kjeldahl-Bestimmungen nachgewiesen hatten (9, 10), zeigen Tuberkelbazillen in der Tiefe flüssiger Nährböden konstantes, logarithmisches Wachstum, dessen Geschwindigkeit vom Nährboden abhängt. Darum muß die Zeit, bis verschiedene, in ihrer Größe definierte Inocula sich bis zu einer bestimmten Masse, z. B. bis zur Sichtbarkeit im Reagensglas, vermehrt haben, den negativen Logarithmen der Inocula direkt proportional sein. Man beimpft nun nach *Youmans* Reagensgläser mit in Zehnerpotenzen kleiner werdenden Bazillenmengen. Die Reagensgläser müssen täglich untersucht werden, ob ein «Bodensatz» aufgetreten ist. Bei gewisser Übung im Ablesen wird der «erste Bodensatz» eine recht kon-

stante Größe sein. In einem semilogarithmischen Koordinatensystem mit den negativen Logarithmen der Inocula auf der Ordinate und der Zeit in Tagen auf der Abszisse wird für jede Impfmenge in der ihr entsprechenden Höhe und über dem Tag, an dem sie zur Sichtbarkeit auswuchs, ein Punkt eingesetzt. Da das Wachstum logarithmisch ist, liegen alle Punkte auf einer Geraden bzw. gruppieren sich um eine solche. Je schneller das Wachstum, um so steiler, je langsamer, desto flacher die Gerade. Die Steigung bezeichnet die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bazillen und wird von *Youmans* Wachstumskonstante oder k genannt. Aus ihr läßt sich die Generationszeit nach der Formel $G = \frac{\log 2}{k}$ berechnen (6).

Ein Ersatz von Albumin fr.V. durch Vollserum wäre für ein Institut, das für den routinemäßigen Nachweis von Tuberkelbazillen einen festen Agarnährboden nach *Dubos* verwendet, auch finanziell interessant, weil das Albumin sehr teuer ist.

In eigenen Untersuchungen haben wir mit der Methode von *Youmans* geprüft, wie Albumin fr.V. und Vollsera von Rindern und Pferden die Generationszeit von H37Rv beeinflussen. Bei den Sera richteten wir das Augenmerk auf individuelle Unterschiede, von denen *Youmans*, der stets von Rinderserum schlechthin spricht, nichts berichtet. Wir erprobten ferner den von *Dubos* empfohlenen Ölsäurezusatz. Nur wenige Versuche widmeten wir endlich der Frage nach Natur und Lokalisation der in den Sera enthaltenen fördernden oder hemmenden Faktoren.

Wir gebrauchten den Grundnährboden nach *Dubos*, während *Youmans* einen solchen nach *Proskauer* und *Beck* verwendet hat. Die weitgehende Übereinstimmung unserer Generationszeiten mit denjenigen von *Youmans* deutet darauf, daß sich die Grundnährböden gegenseitig vertreten können und daß der Eiweißkörperzusatz allein die Generationszeit bestimmt. Bei Zugabe von Albumin benutzten wir zudem mit genau gleichem Ergebnis beide Grundnährböden (Tab. III). Unsere Serumzusätze betrugen stets 10%, die Endkonzentrationen von Albumin und Ölsäure nach der Vorschrift von *Dubos* 0,5 bzw. 0,005%. Das pH stellten wir mit Phenolrot auf 6,8 ein.

Unsere Methodik stimmt in allen wesentlichen Punkten mit derjenigen von *Youmans* überein (6). Die Inocula stammten ohne Ausnahme aus acht-tägigen Tweenkulturen von H37Rv, deren Dichte wir mit dem Klett-Summerson-photoelektrischen Kolorimeter bestimmten. Die Relation zwischen Trübungsgrad und Bakteriengehalt in mg hatten wir durch besondere Untersuchungen abgeklärt. In je vier «parallele» Reagensgläser verimpften wir sechs Mengen (10^{-3} bis 10^{-8} mg Trockengewicht), bisweilen mehr. Im semilogarithmischen Koordinatensystem erhielten wir daher, für kleine Inocula günstigen Nährboden vorausgesetzt, mindestens sechs Punkte, deren Verbindungsstrecken jeweils annähernd eine Gerade bildeten (Beispiele auf Fig. 1). Als kleinste Impfmenge haben 10^{-8} mg in geeignetem Nährboden regelmäßig zu Wachstum geführt. Wo dieses kleinste Inoculum nicht anging, haben wir von der Berechnung

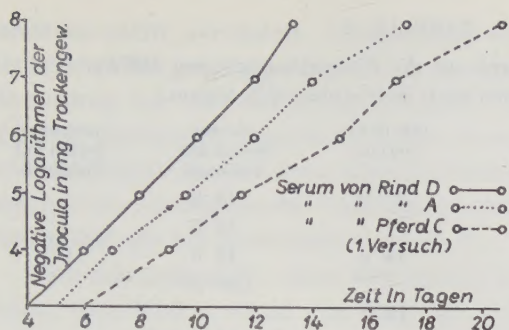


Fig. 1.

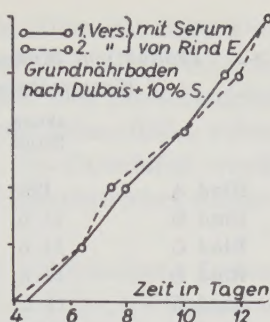


Fig. 2.

Fig. 1. Einfluß von Serumzusatz auf die nach Youmans dargestellte Vermehrungsgeschwindigkeit von H37Rv (Grundnährboden n. Dubos + 10% Serum).

Fig. 2. Einfluß eines Rinderserums auf die nach Youmans dargestellte Vermehrungsgeschwindigkeit von H37Rv; Beispiel für die Reproduzierbarkeit der Versuche.

einer Generationszeit abgesehen. Diese geben wir in ganzen Stunden an und nicht wie Youmans bis auf eine Stelle nach dem Komma genau.

Die Reproduzierbarkeit unserer Versuche war meistens sehr gut (Beispiel auf Fig. 2). Ihr Fehlen, das wir besonders bei Pferdesera ab und zu feststellten, deutet auf eine allgemeine Unzuverlässigkeit des betreffenden Nährbodens. In Tab. I und II sind mehrere Durchschnittswerte aus zwei bis drei Bestimmungen aufgenommen. Wenn sich bei Versuchswiederholungen Differenzen von mehr als 2 h ergaben, berechneten wir keinen Durchschnittswert, sondern haben die Einzelbestimmungen einzeln aufgeführt.

Aus Tab. I und II ist auf den ersten Blick ersichtlich, daß die geprüften Rinder- den Pferdesera weit überlegen waren. Bei den Rindersera waren die individuellen Unterschiede klein, und mit fünf von sieben erreichten wir die von Youmans angegebene und als optimal bezeichnete Generationszeit von 14 h. Bei den übrigen zwei war das Wachstum mit Werten von 18 bzw. 19 h etwas langsamer. Demgegenüber zeigten unsere sieben Pferdesera sehr große individuelle Unterschiede, und wir stellten nur zweimal eine «optimale» (oder sogar noch etwas kürzere) Generationszeit fest. Zweimal war das Wachstum verlangsamt; da die kleinen Inocula noch angingen, erhielten wir aber vollständige Kurven und konnten die Generationszeiten berechnen. Die drei übrigen Pferdesera ließen das Wachstum selbst größter Bazillenmengen nicht mehr zu. Sie hatten geradezu eine bakterizide Wirkung; die beimpften Reagensgläser waren nach fünf bis sieben Wochen steril.

TABELLE I.

Einfluß von Rindersera auf die Generationszeit von H37Rv.

(Grundnährboden nach Dubos plus 10% Serum.)

	aktives Serum	inaktives Serum	aktives Serum mit Oelsäure	inaktives Serum mit Oelsäure
Rind A	19h	15 h	18 h	
Rind B	14 h		15 h	
Rind C	14 h	14 h	15 h	14
Rind D	14 h		(10 ⁻⁶)*	
Rind E	14 h	13 h		
Rind F	14 h		14 h	
Rind G	18 h	18 h	{ 17 h (10 ⁻³)*	

* Berechnung einer Generationszeit unmöglich; die eingeklammerte Zahl bezeichnet das größte nicht angegangene Inoculum in mg.

TABELLE II.

Einfluß von Pferdesera auf die Generationszeit von H37Rv.

(Grundnährboden nach Dubos plus 10% Serum.)

	Albu- min %	Globu- lin %	Eiweiß- Quotient	aktives Serum	inaktives Serum	aktives Serum mit Oelsäure	inaktives Serum mit Oelsäure
Pferd A	3,26	4,38	0,74	(10 ⁻³)*	(10 ⁻⁴)*	(10 ⁻³)*	
Pferd B				(10 ⁻⁷)*	(10 ⁻⁴)*	(10 ⁻⁵)*	(10 ⁻⁴)*
Pferd C	3,07	3,34	0,92	{ 22 h 16 h	{ (10 ⁻³)* 14 h	(10 ⁻³)*	(10 ⁻⁸)*
Pferd D	3,43	5,11	0,67	13 h	15 h		
Pferd E	2,76	4,49	0,61	13 h	13 h	(10 ⁻⁶)*	
Pferd F	2,51	3,78	0,66	22 h	(10 ⁻⁶)*	(10 ⁻⁴)*	
Pferd G	2,90	4,34	0,67	(10 ⁻⁵)*	(10 ⁻⁴)*	(10 ⁻⁴)*	(10 ⁻³)*

* Berechnung einer Generationszeit unmöglich; die eingeklammerte Zahl bezeichnet das größte nicht angegangene Inoculum in mg.

Durch Ölsäurezusatz wurde das Wachstum nie gefördert, recht häufig aber sehr stark gehemmt, was in Gegenwart von Pferdesera sogar die Regel war. Aber auch von den Rindersera konnten nicht alle die Ölsäure entgiften, sodaß große Impfmengen zugrunde gingen.

Durch Inaktivieren der Sera¹ wurden die Generationszeiten

¹ Mit einer Wachstumshemmung durch einen allfälligen, gegen Tuberkelbazillen gerichteten Antikörper war nach den Erfahrungen von *Kirchner*, der mit Sera tuberkulöser Menschen arbeitete (11), nicht zu rechnen.

meistens nicht verändert. Unabhängig vom Alter der Sera kam bisweilen eine geringgradige Beschleunigung (bei «Rind A») oder Hemmung vor (bei einigen Pferdesera). Alter und Hämolysegrad spielten überhaupt innerhalb weiter Grenzen keine Rolle, sofern wir die Basizität alter Sera kompensierten. Als Extremfall wurde mit bestem Erfolg ein 48 Tage altes, stark hämolytisches Rinder-serum mit pH 8,5 verwendet («Rind B»).

Von Albumin fr.V., dem Bestandteil der «klassischen» Dubosschen Nährböden, stand uns Material von zwei Produktionsnummern zur Verfügung (bezogen von Armour Laboratories, London; Herstellungsland USA.). *Youmans* u. Mitarb. haben für industriell erzeugte Äthanolfraktionen aus Rinderplasma nachgewiesen, daß der Wachstumseffekt auf Tuberkelbazillen je nach der Produktionsnummer differieren kann (7). Bei zwei untersuchten Albuminen stellten sie allerdings die übereinstimmende Generationszeit von 16,9 h fest. Demgegenüber fanden wir, wie Tab. III zeigt, mit 18 gegen 14 h nicht nur einen deutlichen Unterschied, sondern auch für die zweite Produktionsnummer jene optimale Generationszeit, die nach *Youmans* nur durch Vollserum und Pro-antithrombin bewirkt werden soll. Die Generationszeit blieb unverändert auf 14 h, selbst wenn wir statt unseres Dubosschen den von *Youmans* verwendeten Grundnährboden nach Proskauer und Beck gebraucht haben.

Merkwürdigerweise hatte die Ölsäure auch zusammen mit Albumin kaum einen wachstumsfördernden Einfluß. Der kleine Unterschied von nur einer Stunde Generationszeit dürfte wohl nicht signifikant sein.

Sieben Rindersera hatten also auf das Wachstum von H37Rv die ungefähr gleich günstige Wirkung wie Albumin fr.V. von zwei Produktionsnummern. Es scheint uns nicht ausgeschlossen zu sein, daß *Dubos* und Mitarbeiter bei einem Teil ihrer Rindersera nicht so sehr eine wachstumshemmende Eigenschaft als vielmehr eine geringere Bindungsfähigkeit für Ölsäure beobachtet haben. Im Basler Hygiene-Institut wird das Albumin des Agarnährbodens nach *Dubos*, der für diagnostische Zwecke verwendet wird, versuchsweise durch Rinder-Vollserum ersetzt. In einer späteren Arbeit werden wir über weitere experimentelle Befunde berichten, die uns diesen Ersatz zu rechtfertigen scheinen.

Worauf beruhen nun die Unterschiede in der Wirkung auf Tuberkelbazillen, wie wir sie vor allem für unsere Pferdesera

festgestellt haben? Wo sind die fördernden oder hemmenden Faktoren zu suchen? Diese Fragen können wir nicht beantworten; wir wollen lediglich einige interessante Beobachtungen mitteilen.

Unter dem Eindruck von *Dubos* und älteren Autoren, z. B. *Boissevin* (12) könnte man einen Zusammenhang mit den Albumin- und Globulingehalten vermuten, etwa in dem Sinne, daß Sera mit größerem relativem Albumingehalt die für Tuberkelbazillen günstigeren Nährböden lieferten. Die in Tab. II eingetragenen Eiweißwerte² zeigen, daß eine so einfache Beziehung, die übrigens nach *Youmans* auch nicht zu erwarten war, niemals besteht.

TABELLE III.

*Einfluß von Albumin fr. V. und Ölsäurezusatz auf die Generationszeit von H37Rv.
Rolle der Produktionsnummer des Albumins und des Grundnährbodens.*

Produktions-Nr. des Albumins	Grundnährboden	ohne Oelsäure	mit Oelsäure
14202	nach Dubos	18 h } 19 h } 17 h }	15 h } 19 h } 19 h }
		18 h	18 h
14613	{ nach Dubos nach Proskauer und Beck	15 h } 13 h }	13 h } 13 h }
		14 h	13 h
		14 h	
	Endkonzentrationen	} Albumin 0,5% Ölsäure 0,005%.	

Aus je zwei Rinder- und Pferdesera haben wir durch Ammonsulfat-Halbsättigung die Globuline ausgefällt, durch Zentrifugieren vollständig entfernt und die restliche Flüssigkeit, welche das Albumin enthalten mußte, während sieben Tagen dialysiert (zunächst gegen fließendes Brunnenwasser und zuletzt gegen Aqua bidestillata). Die so gereinigten Albumine fügten wir in solchen Mengen zum Grundnährboden, daß die Albumin-Endkonzentration derjenigen bei Zusatz des entsprechenden Vollserums gleichkam. Wie aus Tab. IV hervorgeht, führten die Rinderalbumine zu genau den gleichen Generationszeiten wie die Vollsera. Das erste Pferdealbumin ergab ein geringeres Wachstum als das entsprechende «gute» Vollserum. Bei dieser Beobachtung erinnern

² Die Kjeldahl-Bestimmungen wurden freundlicherweise im Med.-Chem. Laboratorium der Med. Universitätsklinik Basel (Vorsteher des Laboratoriums: Dr. H. Baur) durchgeführt.

wir uns an die oft mangelhafte Reproduzierbarkeit der Versuche mit Pferdesera. Wichtig ist, daß beim zweiten Pferdealbumin, das aus einem «schlechten» Serum stammte («Pferd G»), das Wachstum durch den Wegfall der Globuline und der dialysierbaren Substanzen nicht verbessert wurde. Die Albuminfraktion scheint demnach sowohl die fördernden als auch die hemmenden Faktoren zu enthalten.

TABELLE IV.

Vergleich der Generationszeiten von *H37Rv* bei Zusatz von Vollsera und der entsprechenden Albumine.

	Vollserum	Albumin nach Ausfällung der Globuline mit (NH ₄) ₂ SO ₄	«Albumin» nach Dubos
Rind D	14 h	14 h	
Rind G	18 h	19 h	15 h
Pferd D	13 h	(10 ⁻⁶)*	
Pferd G	(10 ⁻⁵)*	(10 ⁻⁶)*	14 h

* Berechnung einer Generationszeit unmöglich; die eingeklammerte Zahl bezeichnet das größte nicht mehr angegangene Inoculum in mg.

Zu unserer Überraschung konnten wir mit dem schon oben (Seite 586) erwähnten Verfahren von *Dubos* (1, 2, 3, 4) selbst aus dem «schlechten» Serum von «Pferd G» die Noxe so vollständig entfernen, daß die Generationszeit optimal wurde. Auch bei «Rind G» konnten wir das Resultat etwas verbessern (Tab. IV). Unsere nach *Dubos* hergestellten Produkte enthielten etwa 50% des ursprünglichen Albumins und 30% der Globuline², stellten also einfach Lösungen mit vermindertem Proteingehalt dar, die nicht mit *Dubos* als Albumine (1, 2) bezeichnet werden können. Was an dem Verfahren von *Dubos* das Wesentliche ist, bleibt unbekannt. Mit Sicherheit können wir aber annehmen, daß es nicht auf die Entfernung der Globuline und deren hypothetischer Begleitstoffe ankommt, sondern es muß das Albumin selbst durch das Ansäuern, Erhitzen und Neutralisieren von Substanzen befreit werden, die durch Dialyse nicht abzutrennen sind.

Literatur.

1. R. J. *Dubos* und G. *Middlebrook*: Amer. Rev. Tbc. 56, 334 (1947). — 2. R. J. *Dubos* und H. *Noufflard*: Ann. Inst. Past. 78, 208 (1950). — 3. R. J. *Dubos*, F. *Fenner* und C. H. *Pierce*: Amer. Rev. Tbc. 61, 66 (1950). — 4. R. J. *Dubos*

- und F. Fenner: J. Exp. Med. 91, 261 (1950). — 5. B. D. Davis und R. J. Dubos: J. Exp. Med. 86, 215 (1947). — 6. G. P. Youmans und A. S. Youmans: J. Bact. 58, 247 (1949). — 7. A. S. Youmans und G. P. Youmans: J. Bact. 60, 561 (1950). — 8. G. P. Youmans und A. S. Youmans: J. Bact. 60, 569 (1950). — 9. G. P. Youmans: J. Bact. 51, 703 (1946). — 10. T. H. Sattler und G. P. Youmans: J. Bact. 56, 235 (1948). — 11. O. Kirchner: Zschr. Imm. Forsch. 76, 343 (1932). — 12. C. H. Boissevin: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 44, 110 (1940).

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. J. Tomcsik, spreche ich den verbindlichsten Dank aus für das Interesse, das er meiner Arbeit stets entgegenbrachte, und für die Freundlichkeit, mit der er mir ihre Veröffentlichung ermöglicht hat.

